

K092

PENENTUAN UMUR PROTOKORM ANGGREK *Phalaenopsis amabilis* TERBAIK SEBAGAI INOKULUM DALAM TRANSFORMASI GENETIK DENGAN MEDIATOR *Agrobacterium tumefaciens*

Ika Nugraheni Ari Martiwi

Program Studi Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Sunan Kalijaga Yogyakarta

Email: ika_mgi@yahoo.com

ABSTRAK

Penentuan umur protokorm sebagai inokulum merupakan faktor yang penting dalam keberhasilan transformasi dan regenerasi transforman. Dalam penelitian ini telah dilakukan transformasi gen pada protokorm anggrek *Phalaenopsis amabilis* umur 1 minggu, 2 minggu, 3 minggu dan 4 minggu setelah penaburan biji. Transformasi dilakukan dengan menggunakan *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404 yang membawa vector pBI121 dengan T-DNA pembawa gen resisten terhadap kanamisin dan gen *GFP* dikontrol dengan promoter konstitutif 35S. Hasil penelitian menunjukkan bahwa inokulum protokorm umur 3 minggu memberikan hasil efisiensi transformasi paling tinggi yaitu 15,079%. Dengan demikian protokorm umur 3 minggu setelah penaburan merupakan inokulum terbaik yang dapat digunakan dalam transformasi genetik pada Anggrek *Phalaenopsis amabilis*.

Kata Kunci: *protokorm, Phalaenopsis amabilis, inokulum, transformasi genetik, Agrobacterium tumefaciens.*

PENDAHULUAN

Pemuliaan tanaman anggrek dengan peningkatan kualitas genetiknya secara hibridisasi seksual untuk menghasilkan kultivar kultivar baru mengalami keterbatasan karena anggrek memiliki siklus hidup yang panjang. Oleh karena itu, teknik transformasi genetik diharapkan dapat menjadi alternatif pilihan yang efisien (Belarmino and Mii, 2000). Salah satu metode transformasi genetik tanaman yang berkembang luas adalah transformasi dengan sistem *plasmid Ti Agrobacterium*. Metode ini memiliki keunggulan relatif lebih murah, sederhana dan menghasilkan rata-rata tanaman transforman relatif lebih tinggi apabila dibandingkan dengan transfer gen secara mekanik (Yu *et al*, 2000; Zambrisky, 1989). Pemanfaatan kemampuan transfer DNA oleh *Agrobacterium* telah banyak diaplikasikan pada penelitian tanaman dikotil. Pada tanaman monokotil sebelumnya tidak mungkin dilakukan sampai ditemukannya metode yang efisien yang berhasil pada beberapa tanaman seperti padi (Hiei *et al*, 1994; Cheng *et al*, 1998), pisang (May *et al*, 1995) dan beberapa anggrek hibrida (Belarmino and Mii, 2000; Yu *et al*, 2001). Kestabilan integrasi gen asing yang diinsersikan ke dalam genom tanaman diperoleh jika metode yang digunakan efektif dan efisien. Terdapat banyak aspek yang berpengaruh dalam keberhasilan transformasi genetik dengan mediator *Agrobacterium tumefaciens* diantaranya adalah aspek material genetik dan suseptibilitas tanaman. Dalam penelitian ini dilakukan transformasi genetik pada protokorm anggrek *Phalaenopsis amabilis*. Penentuan umur protokorm sebagai inokulum merupakan faktor yang penting dalam keberhasilan transformasi dan regenerasi transforman. Oleh karena itu dilakukan transformasi pada protokorm anggrek *Phalaenopsis amabilis* umur 1 minggu, 2 minggu, 3 minggu dan 4 minggu setelah penaburan biji dengan menggunakan *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404 yang membawa vector pBI121 dengan T-DNA pembawa gen resisten terhadap kanamisin dan gen *GFP* dikontrol dengan promoter konstitutif 35S.

BAHAN DAN METODE

Bahan Tanaman

Buah anggrek *Phalaenopsis amabilis* hasil *self* polinasi tanaman anggrek *Phalaenopsis amabilis* umur 4 bulan yang berasal dari Jawa Timur. Buah anggrek disterilisasi dengan cara dicelupkan ke dalam larutan alkohol 70% kemudian dilalukan diatas api, ditunggu api padam dan diulang 3 kali. Buah kemudian diiris dikeluarkan bijinya dan siap ditanam dalam medium *New Phalaenopsis* (NP) yang diberi tambahan ekstrak tomat 100 gram/ liter dan air kelapa 150 ml/liter. Medium kultur diinkubasi dengan pemberian cahaya kontinyu neon 20 watt, suhu 25⁰C. Protokorm diamati selama 4 minggu setelah penaburan meliputi ukuran, warna dan struktur anatominya.

Strain Bakteri dan plasmid

Agrobacterium tumefaciens strain LBA4404 yang membawa vector pBI121 dengan T-DNA pembawa gen resisten terhadap kanamisin dan gen *GFP* dikontrol dengan promoter konstitutif 35S. *Agrobacterium* dikulturkan dalam media LuriaBertani padat (1 mg Trypton, 2,5 mg Yeast, 1 mg NaCl, 250 µl NaOH 0,4N dan 1,25 gr bactoagar ditambahkan antibiotik kanamisin 100 mg/l diinkubasi dengan penggoyangan 120 rpm selama 24 jam



Kokultivasi eksplan

Protokorm umur 1 minggu, 2 minggu, 3 minggu dan 4 minggu setelah penaburan disiapkan, kemudian dipindah ke medium induksi kalus (Medium NP + 2,4D 2mg/l) selama 1 minggu sebelum dikokultivasi dengan kultur *Agrobacterium tumefaciens*. Proses transformasi diawali dengan perendaman protokorm pada medium NP cair dan kultur *Agrobacterium tumefaciens* dengan rasio 1:4. Medium kokultur ditambahkan larutan tween20 sebanyak 10 µl. Perendaman dilakukan selama 30 menit. Kemudian protokorm dikeringkan diatas kertas saring selama 1 jam. Setelah kering protokorm dipelihara di medium induksi kalus (CIM) selama 1 minggu, kemudian disubkultur ke medium induksi tunas (SIM) yang terdiri dari NP+NAA 0.15 mg/l + 2ip 5 mg/l serta ditambahkan antibiotik karbenisilin 50mg/l.

Seleksi tanaman hasil transformasi pada medium kanamisin

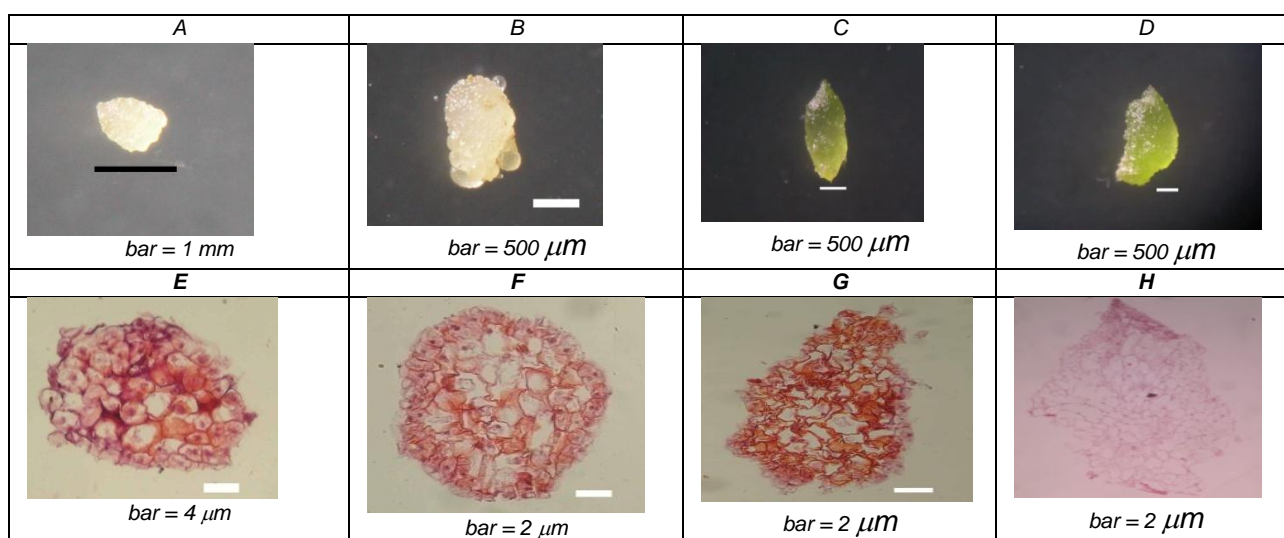
Seleksi tanaman hasil transformasi dilakukan pada medium induksi tunas (SIM) dengan penambahan antibiotik kanamisin 200 mg/l dan karbenisilin 200 mg/l. Pemindahan kultur dilakukan dengan sebelumnya protokorm direndam dalam medium NP cair + antibiotik kanamisin 200 mg/l dan karbenisilin 200 mg/l. Kultur dipelihara di ruang inkubasi dengan suhu 25°C dengan pencahayaan neon 20 watt secara kontinyu

Analisis kandidat transforman menggunakan PCR, dan eksitasi ekspresi GFP

Isolasi DNA genom tanaman anggrek kandidat transforman menggunakan modifikasi metode Murray-Thomson (1980). Deteksi fragmen T-DNA 35S::GFP menggunakan metode PCR dengan primer spesifik untuk GFP (sGFP dan NOS 505). Kandidat transforman diuji ekspresi GFP dengan cara memberikan penyinaran sinar biru (475 nm) dari dark reader pada seluruh bagian tanaman. Transforman GFP akan berwarna fluorescen hijau.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Telah dilakukan pengamatan terhadap protokorm *Phalaenopsis amabilis* meliputi ukuran, warna dan struktur anatominya.



Gambar 1. Pertumbuhan biji anggrek menjadi protokorm secara in vitro: A-D. protokorm tunggal umur 1 minggu, 2 minggu, 3 minggu dan 4 minggu. E-H. Penampang bujur protokorm tunggal umur 1 minggu, 2 minggu, 3 minggu dan 4 minggu.

Tabel 1. Rerata ukuran protokorm anggrek *Phalaenopsis amabilis* pada medium NP yang diikuti selama 4 minggu

Rerata ukuran protokorm (mm) pada umur minggu ke-			
1	2	3	4
0,44 ± 0,05	0,8 ± 0,09	1,54 ± 0,09	2,3 ± 0,08

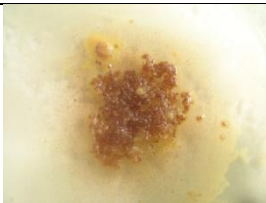
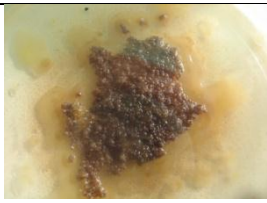




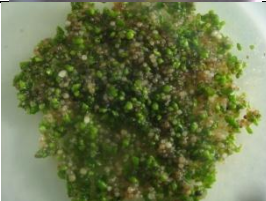
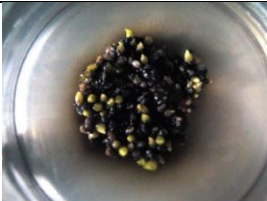
Pada minggu ke-1 protokorm mulai membelah lebih besar, pertumbuhan lebih lanjut tampak di minggu ke-2, protokorm mulai mengawali pembentukan inisial meristem ujung batang pada bagian anterior protokorm yang ditandai dengan sel-sel yang tersusun rapat serta memiliki inti yang besar (Arditti, 1992), sedangkan pada minggu ke-4 protokorm sudah mulai membentuk daun pertama. Dari kenampakan morfologi protokorm tunggal tampak bahwa protokorm umur 3 minggu telah berwarna hijau dan mengalami

pertambahan ukuran yang besar, hal ini menunjukkan pada minggu ke -3 protokorm aktif melakukan pembelahan. Pada minggu ke-4 telah dimulai terjadinya diferensiasi.

Inisial meristem ujung batang ditandai dengan tampaknya sel-sel di bagian ujung dengan ukuran kecil, tersusun rapat, kaya akan sitoplasma serta aktif membelah. Hal ini sesuai dengan penelitian Arditti (1992) dan Oktarina (2003) bahwa 3 minggu setelah penaburan biji sel-sel bagian anterior embrio bersifat sangat meristematik dan membelah dengan cepat selama perkecambahan sehingga dapat dijadikan sebagai starting poin untuk kokultivasi dengan *Agrobacterium tumefaciens*. Status aktif pembelahan sel dan sintesis DNA berperan penting dalam integrasi DNA asing ke dalam inokulum transformasi (Liau *et al.*, 2003).

Pada tabel 1 diperoleh rerata ukuran protokorm pada tiap minggunya, terlihat bahwa pada minggu ke 3 memiliki penambahan ukuran paling cepat dan memiliki ukuran rata-rata adalah 1,54 mm. Ukuran protokorm ini dinyatakan sesuai sebagai inokulum transformasi oleh Mishiba, *et al* (2005) yang menggunakan protokorm anggrek phalaenopsis umur 3 minggu dengan ukuran 1-2 mm sebagai inokulum terbaik untuk transformasi gen GUS dengan mediator *Agrobacterium tumefaciens*

Tabel 2. Kondisi pertumbuhan protokorm setelah dikokultivasi dan diatas medium seleksi NP dengan penambahan antibiotik kanamisin (200mg/l) dan carbenisilin (200mg/l)

Inokulum protokorm umur	Kondisi inokulum setelah kokultivasi	Kondisi inokulum setelah di medium NP+kanamisin dan carbenicilin
1 minggu		
2 minggu		
3 minggu		
4 minggu		

Tabel 3. Frekuensi transformasi *pBI121-p35S::GFP* pada protokorm *P. amabilis* umur 1 minggu, 2 minggu, 3 minggu dan 4 minggu

Inokulum Protokorm umur	Jumlah protokorm yang dikokultivasi	Jumlah tunas yang tumbuh			Efisiensi (%)
		Kan ⁺	Fluorescen ⁺	PCR ⁺ /PCR ⁻	
1 minggu	1890	0	0	0	0
2 minggu	1890	0	0	0	0
3 minggu	1890	285	285	5/0	15,079
4 minggu	1890	87	40	5/2	2.11

Tabel 2 adalah kondisi pertumbuhan protokorm pasca kokultivasi dengan *Agrobacterium tumefaciens* yang membawa vector pBI121 dengan T-DNA pembawa gen resisten terhadap kanamisin dan gen *GFP* pada medium seleksi NP ditambahkan dengan antibiotik kanamisin 200 mg/l, protokorm yang masih dapat tumbuh hijau dengan baik pada medium ini merupakan *putative* transforman. Pada protokorm umur 1 dan 2 minggu tidak terdapat sama sekali protokorm yang berwarna hijau setelah transformasi hal ini dimungkinkan karena kondisi protokorm masih terlalu rentan terhadap infeksi *Agrobacterium tumefaciens*. Tampak dari kondisi *overgrowth* *Agrobacterium* pada medium kultur. Pada inokulum protokorm minggu ke 3 dan ke 4 terdapat pertumbuhan protokorm yang berwarna hijau, dengan jumlah lebih banyak pada umur minggu ke 3, namun dari hasil analisis deteksi fluresent dan PCR tampak tidak semua yang tumbuh hijau memberikan deteksi positif (tabel 3). Hal ini dimungkinkan adanya faktor resistensi tanaman terhadap antibiotik, umur dan ukuran inokulum berpengaruh pada tingkat resistensi (Yang *et al*, 1999) Hal ini disebabkan karena anggrek dikenal resisten terhadap aminoglikosida seperti kanamisin dan gentamisin sehingga konsentrasi kanamisin tinggi dibutuhkan untuk menyeleksi secara selektif tanaman anggrek transforman dan semakin tua umur protokorm tingkat resistensi terhadap kanamisin semakin meningkat (Lin *et al*, 1995).

KESIMPULAN DAN SARAN

Protokorm anggrek *Phalaenopsis amabilis* umur 3 minggu setelah penaburan biji merupakan inokulum terbaik untuk transformasi genetik via *Agrobacterium tumefaciens* ditunjukkan dengan efisiensi transformasi sebesar 15,079%. Selanjutnya perlu adanya penelitian lanjutan untuk lebih menyempurnakan metode transformasi genetik ini pada tanaman anggrek.

DAFTAR PUSTAKA

- Arditti, J. (1992). *Fundamentals of Orchid Biology*. John Wiley and Sons. New York. P 73, 144, 155
- Belarmino, M.M. & Mii, M. (2000). *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of a *Phalaenopsis* orchid. *Plant Cell Reports* 19: 435-442
- Cheng, M., Fry, J.E., Pang, S.Z., Zhou, H.P., Hironaka, C.M., Duncan, D.R., Corner, & Wan, Y.C. (1997). Genetic Transformation of Wheat Mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiology* 115: 971-980
- Hiei, Y., Ohta, S., Komari, T. & Kumashiro, T. (1994). Efficient Transformation of Rice (*oryza sativa*) Mediated by *Agrobacterium* and sequence Analysis of the Boundaries of the T-DNA. *The Plant Journal* 6: 271-282
- May, G.D., Afza, R., Mason, H.S., Wiecko, A., Novak, F.J. & Arntzen, C.J. (1995). Generations of Transgenic Banana (*Musa acuminata*) Plants via *Agrobacterium Mediated Transformation*
- Liau, C.H., You, S. J., Prasad, V., Hsiao, H.H., Lu, J.C., Yang, N.S. & Chan, M.T. (2003). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of an *Oncidium* Orchid. *Plant Cell Reports* 21: 993-998.
- Mishiba, K., Chin, D.P. & Mii, M. (2005). *Agrobacterium* Mediated Transformation of *Phalaenopsis* by targeting protokorm at early stage after germination. *Plant Cell Report* 24: 297-303
- Murray, M.G. & Thomson, W.F. (1980). Rapid Isolation of High Molecular Weight Plant DNA. *Nucleic Acid Research* 4321-4325
- Yang, J., Lee, H.J., Shin, D.H., Oh, S.K., Seon, J.H., Paek, K.Y. & Han, K.H. (1999). Genetic transformation of *Cymbidium* orchid by particle bombardment. *Plant Cell Reports* 18:978-984.
- Yu, H., Yang, S. H. & Goh, C. J. (2000). DOH1, a Class 1 KNOX Gene, Is Required for Maintenance of the Basic Plant Architecture and Floral Transition in Orchid. *The Plant Cell* 12 : 2143-2159.
- Zambrisky, P., Teme, J. & chell, J. (1989). Transfer and function of T-DNA genes from *Agrobacterium* Ti and Ri plasmid in plants. *Cell* 56 : 193-201

DISKUSI

Penanya 1 (Sulistiono – P. Biologi UNP Kediri)

Agrobacterium sering kali digunakan pada bidang bioteknologi transgenik penyisipan secara langsung. Bagaimana mekanisme infeksi dari plasmid *Agrobacterium* hingga menuju intisel tanaman?

Jawab:

Pada saat tanaman dikokultivasi, tanaman tersebut akan menghasilkan luka. Luka tersebut menghasilkan asetosilimon atau senyawa fenolik yang dapat menarik *agrobacterium* untuk masuk. Kemudian terdapat mekanisme urutan mulai veer A hingga veer G yang mekanismenya sangat panjang dan terdapat pula *nuclear localitation signal* yang akan membawa sekuen menuju ke genom tanaman sehingga akan berintegrasi.



Penanya 2 (Agus Muji Santoso – Universitas Nusantara PGRI Kediri)

Berapa umur biji dan konsentrasi kanamisin serta asetosin yang digunakan dalam penelitian?

Jawab:

Dalam perkecambahan biji anggrek medium sangat berpengaruh dan medium yang pemakalah gunakan adalah new falenopsis yang memiliki komposisi yaitu air kelapa 100 mg/l dan air rebusan tomat 150 mg/l.

Untuk konsentrasi kanamisin (telah dioptimalisasi) yang digunakan adalah 200 mg/l. Pemakalah tidak menggunakan asetosin, tetapi menggunakan twin 20.

